

Dynamic superparamagnetic markers

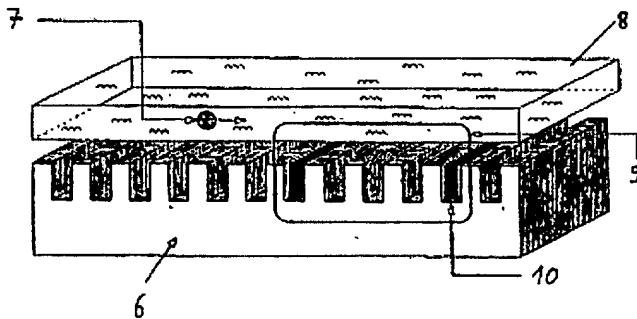
BEST AVAILABLE COPY

Patent number: DE10020376
Publication date: 2001-11-08
Inventor: WOLF BERNHARD (DE); KOCH MARTIN (DK);
STETTER ERNST (DE)
Applicant: INST ZELLTECHNOLOGIE E V (DE)
Classification:
- **international:** A61K49/18; A61M1/36; G01N33/543; G01N33/569;
A61K49/06; A61M1/36; G01N33/543; G01N33/569;
(IPC1-7): G01N33/553; A61L2/02; C12N13/00;
C12Q1/04; G01N15/00; G01N33/483
- **europen:** A61K49/18P; A61K49/18P6; A61K49/18W; A61M1/36;
G01N33/543D4; G01N33/569H
Application number: DE20001020376 20000426
Priority number(s): DE20001020376 20000426

[Report a data error here](#)

Abstract of DE10020376

The invention relates to: the use of dynamic magnetic fields (DM fields) or DM field generators for identifying and/or sorting cells, cell components or pathogens; the use of said fields or field generators for eliminating pathogens contained in liquids; methods or procedures for treating infected cells or tumour cells; the use of superparamagnetically marked active substances for producing a preparation to be used in a method for treating infected cells or tumour cells, said method comprising treatment with a DM field or DM field generator; and the combination of superparamagnetically marked active substances or superparamagnetic beads with a DM field generator. Fig. 3 illustrates the example of a microscope (12), under which a superparamagnetically marked sample (15) is subjected to the DM alternating field that is created by the field generator (11), thus setting the displaced marked objects (e.g. cells) in motion. Said cells can then be identified in a specific manner.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND
MARKENAMT

Offenlegungsschrift

⑯ DE 100 20 376 A 1

⑯ Int. Cl. 7:

G 01 N 33/553

G 01 N 33/483

C 12 Q 1/04

A 61 L 2/02

C 12 N 13/00

G 01 N 15/00

⑯ Aktenzeichen: 100 20 376.0

⑯ Anmeldetag: 26. 4. 2000

⑯ Offenlegungstag: 8. 11. 2001

DE 100 20 376 A 1

⑯ Anmelder:

Institut für Zelltechnologie e.V., 18119 Rostock, DE

⑯ Vertreter:

Patent- und Rechtsanwaltssozietät Maucher, Börjes
& Kollegen, 79102 Freiburg

⑯ Erfinder:

Wolf, Bernhard, Prof. Dr. nat., 79252 Stegen, DE;
Koch, Martin, Kopenhagen, DK; Stetter, Ernst,
64342 Seeheim-Jugenheim, DE

⑯ Entgegenhaltungen:

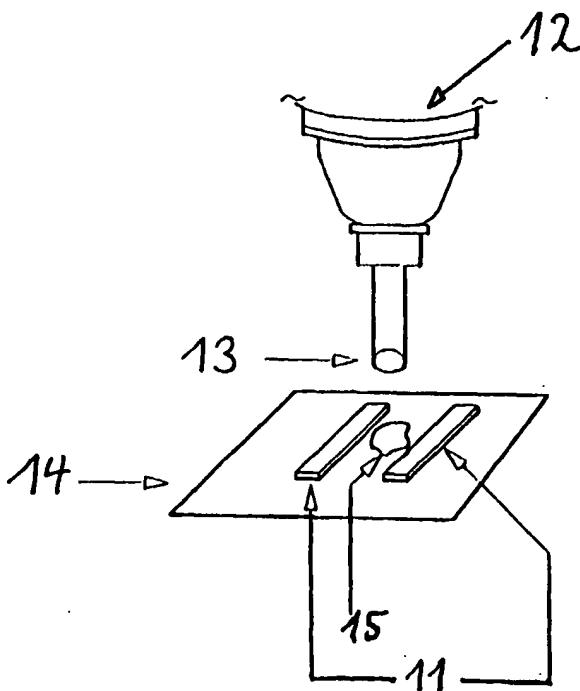
DE	198 23 719 A1
DE	197 26 282 A1
US	60 20 210 A
US	59 68 820 A
WO	99 27 369 A1
WO	90 07 322 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Dynamische Marker

⑯ Die Erfindung betrifft die Verwendung von dynamischen Magnetfeldern (DM-Felder) oder DM-Felderzeugern zum Erkennen und/oder Sortieren von Zellen, Zellbestandteilen oder Pathogenen, die Verwendung dieser Felder oder Felderzeuger zur Reinigung von Flüssigkeiten von Pathogenen, Methoden oder Verfahren zur Behandlung von infizierten Zellen oder Tumorzellen, die Verwendung superparamagnetisch markierter Wirkstoffe zur Herstellung eines Präparates zur Anwendung in einem Verfahren zur Behandlung von infizierten Zellen oder Tumorzellen, das die Behandlung mit einem DM-Feld oder DM-Felderzeuger umfasst, sowie die Kombination von superparamagnetisch markierten Wirkstoffen oder superparamagnetischen Beads mit einem Erzeuger eines DM-Feldes. Fig. 3 zeigt als Beispiel ein Mikroskop (12), unter dem eine superparamagnetisch markierte Probe (15) dem durch den Felderzeuger (11) erzeugten DM-Wechselfeld ausgesetzt wird und so die bewegten markierten Objekte (z. B. Zellen) in Bewegung gesetzt und damit spezifisch erkennbar werden.



DE 100 20 376 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung von dynamischen Magnetfeldern (DM-Felder) oder DM-Felderzeugern zum Erkennen und/oder Sortieren von Zellen, Zellbestandteilen oder Pathogenen, die Verwendung dieser Felder oder Felderzeuger zur Reinigung von Flüssigkeiten von Pathogenen, Methoden oder Verfahren zur Behandlung von infizierten Zellen oder Tumorzellen, die Verwendung superparamagnetisch markierter Wirkstoffe zur Herstellung eines Präparates zur Anwendung in einem Verfahren zur Behandlung von infizierten Zellen oder Tumorzellen, das die Behandlung mit einem DM-Feld oder DM-Felderzeuger umfasst, sowie die Kombination von superparamagnetisch markierten Wirkstoffen oder superparamagnetischen Beads mit einem Erzeuger eines DM-Feldes.

10

Hintergrund der Erfindung

[0002] Systeme zum Isolieren von mit superparamagnetischen Beads oder anderweitig paramagnetisch markierten Zellen sind bekannt. Diese benutzen entweder Zellsortierapparaturen (siehe z. B. US 5,837,200), die einen relativ niedrigen Durchsatz haben, oder sie basieren auf dem Anlegen von statischen magnetischen Gleichfeldern, um superparamagnetisch markierte Zellen mittels einer durch einen Magneten, der ein nichthomogenes magnetisches Gleichfeld erzeugt, umgebenen Säule zurückzuhalten und erst nach Auswaschen nicht markierter Zellen durch Entfernen des Magneten auch auswaschbar zu machen (MACS = Magnetically Activated Cell Sorter, kommerziell erhältlich von der Firma Miltenyi Biotec GmbH).

[0003] Bekannt geworden ist auch die Anwendung von Wechselfeldern zur Unterdrückung der Kettenbildung von Häm-Molekülen in durch den Erreger der Malaria, einen Protozoen namens Plasmodium, infizierten Erythrozyten. Eine Form des Erregers hält sich normalerweise in Erythrozyten auf und bewirkt dort durch Aufnahme der Proteinkomponente aus Hämoglobin die Freisetzung von Häm, das sich dann in langen Ketten zusammenlagert. Durch Wechselfelder gelang es, diese Kettenbildung zu hemmen bzw. vorhandene Ketten zu zerstören. Dadurch konnte ein 33 bis 70%-igen Abfall der Anzahl an Parasiten erreicht werden. Die schwach oszillierenden Magnetfelder, die bei diesen Versuchen an der Universität Washington verwendet wurden, sind niederfrequente Magnetfelder. Sie sollen helfen, dem Erreger der Malaria die Lebensbasis durch Zerstörung der gebildeten Hämstrukturen in den Erythrozyten zu entziehen. Das zweiwertige Eisenion im Hämprotein ist nur im deoxygenierten Zustand magnetisch, so dass hier vor allem venöses Blut von Interesse ist.

[0004] Bekannt ist auch ein Verfahren einer dänischen Firma (MEDICO-CHEMICAL LAB, APS), bei dem eine magnetisierte Medizin direkt in die Blutbahn injiziert wird und an der Stelle, wo die Behandlung stattfinden soll, beispielsweise am Ort eines Tumors, durch ein starkes magnetisches Gleichfeld festgehalten und so angereichert wird. Problematisch hierbei war, ein Magnetfeld aufzubauen, das stark genug ist, den Wirkstoff am gewünschten Ort zu halten.

[0005] Schließlich ist auch bekannt, Eisenoxid enthaltende Nanopartikel in einen Tumor zu verabreichen (z. B. durch Injektion) und dann durch Anwendung von Wechselfeldern lokal derart in Schwingungen zu versetzen, daß am Ort der Nanopartikel Temperaturen bis ca. 47°C entstehen. Als Folge zerfällt das entartete Gewebe. In Mäuse verpflanzte Brusttumoren verschwanden so innerhalb einer halben Stunde. Diese an der Humboldt-Universität entwickelte Methode verwendet hochfrequente Felder (kHz, MHz). Die hier wirkenden elektromagnetischen Felder sind jedoch materialkonstanten-abhängig und u. U. inhomogen. Ihre Wirkung kann im Unterschied zu denjenigen der dynamischen Wechselfelder, die mit der ersten Maxwellschen Gleichung beschrieben werden können, mit der zweiten Maxwellschen Gleichung beschrieben werden (Induktionsgesetz).

1. Maxwell'sche Gleichung: $\oint \mathbf{H} \cdot d\mathbf{s} = \int (\mathbf{J} + \partial \mathbf{D} / \partial t) \cdot d\mathbf{A}$
 2. Maxwell'sche Gleichung: $\oint \mathbf{E} \cdot d\mathbf{s} = - \int \partial \mathbf{B} / \partial t \cdot d\mathbf{A}$

45 A = Fläche

H = Magnetisches Feld

E = Elektrisches Feld

J = Stromdichte

s = Wegstrecke

50 B = Magnetische Flussdichte

t = Zeit

 $\partial \mathbf{D} / \partial t$ = Verschiebungsstromdichte

[0006] Alle genannten Systeme verwenden entweder statische magnetische Gleichfelder oder einfache (oszillierende) Wechselfelder.

[0007] Insbesondere in der eingangs erwähnten MACS-Technik werden magnetische Felder angewendet, die von einem Permanentmagneten erzeugt werden. Diese inhomogenen, statischen magnetischen Gleichfelder sind Materialkonstanten-unabhängig (J. C. Maxwell, On Faraday's Lines of Force, Scientific Papers 1855, 1856, nachgedruckt Dover, New York 1952), können also Flüssigkeiten durchdringen und darin befindliche magnetische Partikel erreichen und auf diese einwirken. Das magnetische System ist jedoch nach dessen Installation in der Anlage unveränderlich festgelegt. Es steht außer Zweifel, dass eine Vielzahl magnetisch markierter Objekte (z. B. Zellen) in Lösung von einem starken Permanentmagneten angezogen werden, wenn auch unterschiedlich stark.

[0008] Die Patentanmeldung WO 95/19217 (entspricht EP 0 740 578) beschreibt eine Vorrichtung, die es ermöglicht, regelrecht sich bewegende Magnetfelder zu erzeugen. Diese wird in der angegebenen Patentanmeldung zur Bewegung von Ionen in Mauerwerk mit dem Ziel, Salze aus Mauerwerk zu entfernen, angewendet.

[0009] Zur Therapie proliferativer Erkrankungen, wie Tumorerkrankungen oder Krebs, werden bislang vor allem Chemotherapie, Bestrahlung, chirurgische Behandlung, Cryothermie (Einfrieren), Hyperthermie (lokal oder im ganzen Körper abnorm erhöhte Temperatur) und Immuntherapie, oder Kombinationen davon, verwendet, zur Behandlung von In-

DE 100 20 376 A 1

fektionen beispielsweise Antibiotika oder andere Chemotherapeutika, z. B. antiparasitäre oder antivirale Wirkstoffe. Es besteht ein Bedürfnis, neue Vorrichtungen und Verfahren zur Therapie und Diagnose derartiger Erkrankungen zur Verfügung zu haben.

[0010] Anfang 2000 wurde in der Deutschen Ärztezeitung berichtet, dass Krebskulturen in Laborgefäßen in ihrem Wachstum beeinträchtigt werden können, wenn sie durch Lautsprecher beschallt wurden. Dieses einfache Experiment zeigt, dass die Zellkulturen (Zellen eines Lungenkarzinoms) bei mechanischer Belastung langsamer wachsen als in einer unbeschallten Kontrollgruppe. Es wäre interessant, derartige mechanische Effekte auf andere Weise hervorzurufen.

Zusammenfassung der Vorteile der Erfindung

[0011] Die dynamische Markierungstechnik gemäss der Erfindung erlaubt, im Unterschied zum Stand der Technik jetzt mit magnetischen Bewegungsfeldern (dynamische Magnetfelder, nachfolgend DM-Felder genannt) zu arbeiten. Diese können so kombiniert werden, dass auch in stehenden (ohne Hall-Effekt) oder bewegten Flüssigkeiten niedriger bis hoher (z. B. gelartiger) Viskosität dynamische Effekte auf ruhende oder bewegte markierte Objekte erzeugt werden können. Die Frequenz dieser magnetischen Felder kann so gewählt werden, dass sie auch als materialkonstantenunabhängig angesehen werden können (der frequenzabhängige Summand der ersten Maxwell'schen Gleichung ist hier zu vernachlässigen, der erste Summand ist völlig materialkonstantenunabhängig). Dies bedeutet, dass Felder dieser Art nahezu verlustfrei entsprechende Flüssigkeiten durchwandern können, um dann auf alle magnetischen, z. B. mit magnetischen Beads markierten Objekte, etwa Zellen oder z. B. Liposomen oder superparamagnetisch markierte Wirkstoffe, magnetisch-dynamisch einwirken zu können (beispielsweise durch Drehungen, Transport oder Aufbau von (nach Eliminieren der Felder reversibel sich auflösenden) Strukturbarrieren). Durch eben diese dynamische Charakteristik der für die dynamische Markierung verwendbaren Felder (DM-Felder) können ferner auch elektrische Kräfte in Flüssigkeiten erzeugt werden, die magnetische wie auch unmagnetische Ionen- beeinflussen können (siehe unten Fig. 1).

[0012] Die schwach oszillierenden Felder, die in den eingangs erwähnten Versuchen an der Universität Washington gegen Malaria verwendet wurden, können ebenfalls mittels eines in der vorliegenden Erfindung verwendeten DM-Felderzeugers hervorgerufen werden, wenn man den sonst langgestreckten DM-Felderzeuger rund ausführt, dem Stator einer Drehstrommaschine vergleichbar, und beispielsweise als eine Art Manschette um einen Arm, ein Bein oder den ganzen Körper legt. Bevorzugt finden jedoch nicht ringförmige DM-Felderzeuger Verwendung.

[0013] Es ist auch möglich, mittels der DM-Felder eine mechanische Belastung von infiziertem Gewebe oder Tumorgewebe hervorzurufen, z. B., indem man superparamagnetische Beads in der Nähe eines Tumors oder eines infizierten Organs (z. B. Leber, Gehirn) appliziert (beispielsweise durch Injektion am Tumorort oder durch Transport mittels eines DM-Feld selbst, oder insbesondere durch Administration von mit gegen den Tumor oder infizierte Zellen gerichteten Antikörpern, die superparamagnetisch markiert sind, so dass sie sich wegen der Bindung an Tumorzellen nach beispielsweise Injektion oder Infusion an Tumorzellen anreichern) und dann magnetisch mittels DM-Feldern "rüttelt" oder rotiert. Der DM-Felderzeuger kann hier den entsprechenden Erfordernissen in Form, Leistung und Frequenz angepasst werden.

[0014] Bei Anwendung von Ferritmaterialien anstelle von geschichteten, gegeneinander isolierten Blechen oder massiven Komponenten (beispielsweise geeignet für Frequenzen unter 15 Hz) als Bestandteil des Magnetfelderzeugers können auch höhere Frequenzen (beispielsweise im kHz-Bereich) durch ein DM-Gerät erzeugt werden.

[0015] Die schon beschriebenen Hyperthermieeffekte durch in Tumoren injizierte Eisenoxidpartikel und von aussen angelegte Wechselfelder sollen nach Berichten der Berliner Forscher der Charité/Humbolduniversität bei Mäusen Tumoren zerstört haben. Elektromagnetische Wechselfelder, die über grössere Distanzen (Körper des Menschen) magnetisierte Tumoren wegheizen sollen, sind aufgrund der langen Wege mit unterschiedlichen Materialkonstanten (Gewebe, Wasser etc.) problematisch. Ein zusätzliches Problem ist wohl auch hierbei die "Magnetisierung" des Tumors. Einfaches Einspritzen von superparamagnetischen Beads gewährleistet nicht immer eine gleichmässige, optimale Verteilung. Dies kann jedoch mit der DM-Technik in Kombination mit Beads, an die Antikörper gegen Tumorzellen oder infizierte Zellen konjugiert sind, und erforderlichenfalls forciertes dynamisches Anpressen über die blutversorgten Teile des erkrankten Gewebes gelingen.

[0016] Die Anwendungsmöglichkeiten von DM-Feldern sind somit ausserordentlich vielfältig.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0017] Die Erfindung betrifft die Verwendung von dynamischen Magnetfeldern (DM-Felder) oder von DM-Felderzeugern zum Erkennen und/oder Sortieren von Zellen, Zellbestandteilen oder Pathogenen, insbesondere solchen Zellen, Zellbestandteilen oder Pathogene, an die superparamagnetische Beads gebunden sind.

[0018] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von DM-Feldern oder von DM-Felderzeugern zur Reinigung von Flüssigkeiten von Pathogenen, insbesondere solchen, an die superparamagnetische Beads gebunden sind.

[0019] Die Erfindung betrifft auch Methoden oder Verfahren zur Diagnose (Erkennen von kranken, z. B. infizierten oder Tumorzellen) und insbesondere Behandlung von infizierten Zellen oder Tumorzellen, welche die Nutzung von DM-Feldern oder DM-Felderzeugern und insbesondere zusätzlich superparamagnetischen Beads umfassen, die am Ort der infizierten Zellen oder Tumorzellen (insbesondere nach entsprechend lokalisierter Administration, z. B. Injektion, oder, insbesondere, wenn die superparamagnetischen Beads an für die genannten Zellen spezifische Antikörper (direkt, über einen Spacer oder über Liposomen) gebunden sind, systemischer Administration) vorliegen oder an diese gebunden sind.

[0020] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von superparamagnetisch markierten Wirkstoffen zur Herstellung eines Präparates zur Anwendung in einem Verfahren zur Behandlung von infizierten Zellen oder Tumorzellen, das die Behandlung mit einem DM-Feld oder mit einem DM-Felderzeuger sowie von superparamagnetischen Beads umfasst, die (a) am Ort der Zellen verabreicht (z. B. injiziert), (b) mit einem DM-Feld oder DM-Felderzeuger dorthin manövriert (vor allem durch Körperhöhlen) und/oder (c) an die genannten Zellen, z. B. über an die Beads gebundene, für Antigene auf den zu behandelnden Zellen spezifische Antikörper (die insbesondere direkt oder über Spacer oder Liposomen an die

Beads gebunden sind), spezifisch gebunden werden oder sind und gewünschtenfalls einen gegen Infektion oder Tumoren wirksamen Wirkstoff (direkt oder über einen Spacer kovalent an die Beads gebunden oder in Liposomen, die an die Beads gebunden sind) tragen; sowie die Kombination von superparamagnetisch markierten Wirkstoffen oder superparamagnetischen Beads mit einem Erzeuger eines DM-Feldes (DM-Felderzeuger).

5 [0021] Die vor- und nachstehend genannten Ausdrücke haben vorzugsweise im Rahmen der vorliegenden Offenlegung die folgenden Bedeutungen, soweit nichts anderes angegeben ist – einzelne oder mehrere der entsprechenden spezifischeren Definitionen können anstelle der obigen allgemeineren Definitionen verwendet werden und betreffen dann jeweils bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung:

[0022] Verwenden von DM-Feldern oder DM-Felderzeugern und superparamagnetischen Beads bedeutet insbesondere, dass DM-Felder oder DM-Felderzeuger angewendet werden, um die superparamagnetischen Beads, insbesondere die an Zellen, Zellbestandteile und/oder Pathogene gebundenen, in Bewegung zu versetzen, beispielsweise in longitudinale Bewegung oder Rotation, oder (durch Erzeugen statischer Wechselfelder mittels eines DM-Felderzeugers) aus ihnen Strukturen, wie Barrieren oder stäbchenförmige Strukturen, zu formen.

10 [0023] DM-Felder (magnetische Bewegungsfelder) sind dadurch gekennzeichnet, daß sie der ersten Maxwellschen Gleichung gehorchen und somit magnetische Effekte betreffen, die bei Wahl ausreichend niedriger Frequenzen, da dann der zweite Summand der 1. Maxwell'schen Gleichung vernachlässigbar ist, materialkonstantenunabhängige Durchdringung zeigen (im Unterschied hierzu beruhen z. B. die an der Charité genutzten Felder auf der zweiten Maxwellschen Gleichung und basieren auf dem Prinzip der Induktion).

15 [0024] DM-Felderzeuger sind in WO 95/19217 beschrieben, sie können in den Abmessungen an die Bedürfnisse angepasst werden (z. B. durch Dimensionierung, etwa so, dass sie auf einem Mikroskopiertisch verwendet werden können, bis hin zu sich über einen ganzen Körper erstreckenden Spulensystemen. Im Prinzip entsprechen sie "Linearmotoren".

[0025] Erkennen von Zellen, Zellbestandteilen oder Pathogenen bedeutet, dass diese nach Markierung mit superparamagnetischen Beads durch Anlegen von magnetischen Bewegungsfeldern in Rotation versetzt oder gerichtet bewegt werden können und so beobachtet und in Gegenwart nichtmarkierter Zellen erkannt (identifiziert) werden können, vorzugsweise mikroskopisch. Dies bedeutet, dass auch eine Methode zur Diagnose (beispielsweise Erkennen von kranken Zellen aus Gewebezellen oder Blut) Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist.

20 [0026] Sortieren von Zellen, Zellbestandteilen oder Pathogenen bedeutet, dass entsprechend superparamagnetisch markierte Zellen, Zellbestandteile oder Pathogene aus Lösungen durch Anlegen beispielsweise von magnetischen Bewegungsfeldern oder durch Erzeugen von Strukturen (Fig. 4, (18)) aus Gemischen mit unmarkierten Gegenstücken herausgesortiert oder angereichert werden können, beispielsweise aus fließenden Lösungen, indem sie an eine Seite gelenkt und nur dort abgezweigt werden, oder aus stehenden Lösungen, insbesondere Blutkonserven, Blutserumkonserven oder Blutplasmakonserven oder Nährmedien, beispielsweise für die Organtransplantation oder Zellkulturen, die frei von Pathogenen sein müssen), indem sie ebenfalls an eine Stelle, z. B. eine Seite, konzentriert und dort (beispielsweise durch Absaugen) entfernt werden. Vorteil ist, dass beispielsweise Nährmedien für die Zellkultur oder aus Blut gewonnene Konserven so gereinigt werden können. Durch sequentielle Anwendung unterschiedlicher Antikörper können so auch mehrere Komponenten aus einer Probe gewonnen werden.

25 [0027] Zellbestandteile sind beispielsweise Organellen, wie Lysosomen, Endoplasmatisches Retikulum, Vesikel der Zellmembran (z. B. Mikrosomen, kanalikuläre Membranvesikel aus Gallenkanälchen) und dergleichen. Pathogene sind auch Krebszellen, z. B. (beispielsweise zur Metastasenbildung geeignete) Tumorzellen oder Blutkrebszellen oder abnorm proliererende Zellen aus Knochenmark.

30 [0028] Pathogene sind beispielsweise Bakterien einschließlich Mycoplasmen, Viren (z. B. HIV, Hepatitis-Viren, wie HCV), Pilze (wie Hefen) oder Parasiten (wie Protozoen, z. B. Trypanosomen oder Plasmodien, Würmer oder dergleichen).

35 [0029] Die superparamagnetische Markierung gelingt vorzugsweise durch superparamagnetisch markierte Antikörper oder durch superparamagnetisch markierte Liposomen, die auch Antikörper, welche für die entsprechenden Zellen oder Pathogene, d. h. spezifisch oder verstärkt dort exprimierte Antigene, spezifisch sind und diese binden. Diese Antikörper sind beispielsweise gegen (z. B. auf der Zelloberfläche exprimierte) Tumoralantigene, auf der Zelloberfläche (beispielsweise durch antigenpräsentierende Proteine wie solche des Major Histocompatibility Complex oder dergleichen) präsentierte Peptide (beispielsweise aus Pathogenen, wie Viren oder Mycoplasmen) oder direkt auf den Pathogenen selbst vorliegende Antigene gerichtet und durch Standardverfahren erhältlich.

40 [0030] Das Sortieren von Zellen, Zellbestandteilen oder Pathogenen gelingt ebenfalls mittels entsprechend superparamagnetisch markierten Antikörpern oder Liposomen, wobei ebenfalls aus fließenden oder stehenden Flüssigkeiten die markierten Komponenten an bestimmten Stellen angereichert und dann selektiv abgeleitet oder abgesaugt werden können. Das Reinigen von Flüssigkeiten von Zellen, Zellbestandteilen oder Pathogenen gelingt ebenfalls auf analoge Weise.

45 [0031] Die Behandlung von infizierten Zellen oder Tumorzellen kann beispielsweise extrakorporal erfolgen (beispielsweise in Zell- oder Gewebskulturen, etwa zum Züchten von Leberzellen aus einer virusinfizierten Leber, oder aus isoliertem Knochenmark eines Tumorpatienten, um jeweils infizierte bzw. Tumorzellen zu entfernen und so die Reimplantation zu ermöglichen). Auf diese Weise können (durch Heraussortieren markierter infizierter oder tumoraler Zellen, durch deren mechanische Zerstörung, durch kräftige Bewegung und/oder durch Administration mit Wirkstoffen beladener superparamagnetischer, antikörpergebundener Beads, deren Wirkstoffe im DM-Feld durch die stärkere mechanische Belastung der gebundenen Zellen und die selektive Aufkonzentrierung an den Zellen dort verstärkt wirken) die unerwünschten Zellen beseitigt und so rein "gesunde" Zell- oder Gewebskulturen oder Zellen oder Gewebeteile gewonnen werden, die beispielsweise zur heterologen oder vorzugsweise autologen Transplantation verwendet werden können.

50 [0032] Die Behandlung kann aber auch im Körper erfolgen, vorzugsweise bei einem Warmblüter, wie einem Menschen, insbesondere, wenn dieser einer entsprechenden Behandlung bedarf. So können antikörper- und superparamagnetisch markierte Beads, vorzugsweise mit einem oder mehreren Wirkstoffen beladen, einem Warmblüter verabreicht und mittels DM-Feldern nach "Andocken" am erkrankten Gewebe in Bewegung versetzt werden, was einerseits die erkrankten Zellen mechanisch belastet, andererseits dem Wirkstoff verstärkt aussetzt (beispielsweise, da dieser durch das DM-

Feld ins Zellinnere gelangt.

[0033] Auch nicht-markierte Beads können (insbesondere in Körperhöhlen, wie Lunge, Magen-Darm-Trakt, Bauchhöhle, Pleuraspalt, Gehirncavernen, Rückenmarkskanal, Hohlräume im Bereich von Muskelfaszien etc.) Verwendung finden. Diese können erst mittels DM-Feldern an die gewünschte Stelle (z. B. Tumor, infiziertes Organ, z. B. Leber) manövriert und dann vor Ort in Bewegung versetzt werden und so die erkrankten Stellen durch mechanische Belastung für die Abwehrkräfte des Körpers zugänglich machen.

[0034] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von superparamagnetisch markierten Wirkstoffen zur Herstellung eines Präparates zur Anwendung in einem Verfahren zur Behandlung von infizierten Zellen oder Tumorzellen, das die Behandlung mit einem DM-Feld umfasst, sowie die Kombination von superparamagnetisch markierten Wirkstoffen oder superparamagnetischen Beads mit einem Erzeuger eines DM-Feldes, insbesondere, wie in WO 95/19217 beschrieben.

[0035] Superparamagnetische Kugelchen (Beads) sind bekannt, nach an sich bekannten Verfahren herstellbar oder kommerziell erhältlich. Der Ausdruck "Kugelchen" bedeutet nicht zwangsläufig Kugelform, sondern ist im Sinne von "Partikelchen" verwendet.

[0036] Beispielsweise beschreibt die Internationale Patentanmeldung WO 85/02772 Partikelchen, die in einer Kohlenhydrat-, Polyaminosäure- oder Kunststoffmatrix basieren. Beispiele für entsprechende Kohlenhydratmatrices finden sich in PCT/SE82/00381, PCT/SE83/00106 und PCT/SE83/00268, für entsprechende Polyaminosäure-Matrices in US 4,247,406; Kunststoffmatrices, beispielsweise basierend auf Polymeren aus Acrylaten, Polystyrol, etc., sind ebenfalls bekannt. In die Matrix sind beispielsweise Eisenoxidpartikel eingebettet. Das Patent US 4,219,411 beschreibt Polystyrol – und insbesondere auf Polymerisaten von Acrylsäure und ihren Derivaten (wie Acrylamid, Methacrylamid, Acrylsäure, Methacrylsäure, Dimethylaminomethacrylat, Hydroxy-niederalkyl- oder Amino-niederalkylacrylate, wie 2-Hydroxyethyl-, 3-Hydroxypropyl- oder 2-Aminoethyl-methacrylsäure) basierende Matrices mit freien Hydroxygruppen, die mit Cyanogenbromid aktivierbar sind, oder mit freien Carboxygruppen, oder mit freien Aminogruppen, die alle die kovalente Bindung an Moleküle, wie Antikörper, Avidin oder Streptavidin, erlauben. Weitere Patente, die geeignete Partikelmatrices beschreiben, sind US 3,957,741 und US 4,035,316.

[0037] Die superparamagnetischen Eigenschaften werden durch die Einbettung von Metalloxiden, insbesondere Eisenoxid (Fe_3O_4), oder von anderen geeigneten Metallen oder Legierungen erzielt. Die Metallpartikel sind vorzugsweise fein und von relativ gleichmässiger Grösse, so daß der resultierende Partikeldurchmesser vorzugsweise die unten genannten Grössen hat. Die Metalle sind insbesondere Eisen, Nickel oder Kobalt, oder Legierungen, die beispielsweise noch Gadolinium, Dysprosium oder Erbium, ferner Vanadium, oder andere Übergangsmetalle enthalten können. Eisenoxid (insbesondere Magnetit) ist bevorzugt. Einige Ferrite, wie Lithiumferrite, kommen ebenfalls in Frage.

[0038] Bevorzugte Beads haben einen mittleren Durchmesser von 2 μm oder weniger, insbesondere 1 μm oder weniger (um beispielsweise nicht im Kapillarsystem stecken zu bleiben), vorzugsweise von 30 bis 1000 nm, insbesondere von 30 bis bis 300 nm. Besonders bevorzugt sind Beads mit biologisch abbaubarer Matrix, z. B. aus Kohlenhydraten (insbesondere Polysacchariden) oder Polyaminosäuren. Alle diese Beads, wie auch Analoge davon, sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet. Die Beads können auch zusätzlich mit gamma-Strahlern (wie Technetium-99 m) in geringer Aktivität markiert sein, um die Bewegung von ggf. mit Wirkstoffen beladenen Kugelchen mittels einer gamma-Kamera, beispielsweise im Körper, zu verfolgen.

[0039] Insbesondere bietet beispielsweise die Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland, unter der Bezeichnung "MicroBeads" freie oder mit Antikörpern konjugierte Beads mit durchschnittlicher Grösse von rund 50 nm an, die Eisenoxid in einer Polysaccharidmatrix enthalten – diese haben den grossen Vorteil, auch bioabbaubar zu sein, und sind deshalb aufgrund ihrer geringen Grösse sehr bevorzugt. Von der Firma Polysciences, Inc., werden unter der Bezeichnung "BioMag®" Beads von ca. 1 μm Grösse angeboten, die aus einem Eisenoxidkern mit einer Silanhülle bestehen und mit Amino- oder Carboxygruppen funktionalisiert sind, welche die kovalente Bindung an Proteine (wie Antikörper, Avidin, Streptavidin), Glykoproteine, Polysaccharide, Lektine und andere Liganden erlaubt. Sigma-Aldrich bietet ebenfalls superparamagnetische Beads von ca. 1 μm Durchmesser auf Eisenoxidbasis an, die an der Oberfläche als funktionelle Gruppen entweder Carboxy- oder Aminogruppen tragen. Weitere superparamagnetische Beads werden von der Deutschen Dynal GmbH, Hamburg, Deutschland angeboten, und von einer Reihe weitere Firmen.

[0040] Beispiele für Wirkstoffe, die gemäss der Erfindung angewendet werden können, sind insbesondere antitumorwirksame Chemotherapeutika, die (alleine oder als Kombination von zwei oder mehr der genannten Substanzen) erfindungsgemäss als Wirkstoffe Einsatz finden können, insbesondere die in folgender Aufstellung enthaltenen:

(A) Alkylierende Agentien, wie Dacarbazine (DTIC-Dome); Senfgasderivate, wie Mechlorethamine (Mustargen); Ethyleniminderivate, e. g. Triethylenethiophosphoramid (thio-tepa); Procarbazine (Matulane); Alkylsulfonate wie Busulfan (Myeleran); Cyclophosphamid; 4-Hydroxyperoxy-cyclophosphamid (4-HC); Mafosfamid; Ifosfamid; Melphalan (Alkeran); Chlorambucil (Leukeran); Nitrosoharnstoffe wie Cyclohexylnitrosoharnstoff (meCCNU; Carmustin, BCNU, BiCNU) oder Lomustin (CCNU, CeeNU), cis-Platin(II)-diamindichlorid (Platinol oder Cisplatin); Carboplatin (Paraplatin); vorzugsweise quervernetzende Chemotherapeutika, insbesondere bis-alkylierende Agentien, besonders Senfgasderivate wie Mechlorethamin (Mustargen); Alkylsulfonate wie Busulfan; Cyclophosphamid; Melphalan; Chlorambucil; Cisplatin(II) -diamindichlorid oder Carboplatin; oder Verbindungen, die Vernetzungen (cross-links) über ionische Bindungen bewirken, wie etwa Ethylenimin-Derivate, z. B. Triethylen-thio-phosphoramid (Thio-tepa);

(B) Antitumorantibiotica, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, welche Bleomycin(Blenoxane); Anthracycline, wie Daunomycin, Dactinomycin (Cosmegen), Daunorubicin (Cerubidin), Doxorubicin (Adriamycin, Rubex), Epirubicin, Esorubicin, Idarubicin (Idamycin), Plicamycin (Mithracin, früher als Mithramycin bezeichnet) und insbesondere quervernetzende (bis-alkylierende) Antitumorantibiotica, wie Mitomycin C (Mitomycin, Mutamycin) umfasst;

(C) Antimetabolite, z. B. Folsäureanaloga wie Methotrexate (Folex, Mexate) oder Trimetrexat; Purinucleosidanaloga wie Cladribin (Leustatin; 2-Chloro-2'-deoxy-(3-D-adenosin), 6-Mercaptopurin (Mercaptopurin, Purinethol, 6-

MP), Pentostatin (Nipent) oder 6-Thioguanin (6-TG, Tabloid); Pyrimidinanaloge wie 5-Fluoruracil (Fluoruracil, 5-FU), 5-Fluorodeoxyuridin (Flouxuridine, FUDR), Cytosinarabinosid (Ara-C, Cytarabin, Cytosar-U oder Tarabin PFS), Fludarabinphosphat (Fludara) oder 5-Azacytidin; Hydroxyharnstoff (Hydrea); oder Polyaminbiosyntheseinhibitoren, vor allem Ornithindecarboxylas- oder S-Adenosylmethionindecarboxylaseinhibitoren, z. B. die in EP 0 456 133 genannten, insbesondere 4-Amidino-1-indanon-2'-amidinohydrazon;

(D) Pflanzenalkaloide, insbesondere Vincaalkaloide, wie Vinblastin (Velban), Vincristin (Oncovin) oder Vindesin; Epopodophyllotoxine, wie Etoposid (VP-16, VePesid) oder Teniposid (VM-26, Vumon);

(E) hormonal wirksame Agentien und Antagonisten, insbesondere Adrenocorticoide, wie Prednison (Deltasone) oder Dexamethason (Decadron); Progesterone wie Hydroxyprogesteron (Prodox), Megestrolacetate (Megace) oder Medroxyprogesteron (Provera, Depo-Provera); Androgene wie Testosteron oder Fluoxymesteron (Halotestin); Östrogene wie Diethylstilbestrol (DES), Estradiol oder Chlorotriatansien (Tace); synthetische Analoge von LHRH, wie Goserelin (Zoladex); Synthetische Analoge von LH-releasing hormone, wie Leuprolid (Lupron, Lupron Depot); Anti-androgene wie Flutamid (Eulexin); Anti-östrogene wie Tamoxifen; Aromataseinhibitoren wie Aminoglutethimid (Cytadren), Lestrogen (Formestane, 4-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion) (siehe EP 0 162 510), Fadrozol (5-(p-Cyanophenyl)-5,6,7,8-tetrahydroimidazo-[1,5-a] pyridin, siehe EP 0 437 415 und EP 0 165 904), Letrozol (4,4'-{1H-1,2,4-Triazol-1-yl-methylen}-bis-benzonitril, siehe US 4,976,672), Arimidex, 4-(α -(4-Cyanophenyl)- α -fluoro-1-(1,2,4-triazolyl)methyl)-benzonitril (siehe EP 0 490 816) oder 4-(α -(4-cyanophenyl)-(2-tetrazolyl)methyl)-benzonitril (siehe EP 0 408 509); Adrenocytotoxische Agentien, wie Mitotan (Lysodren); Somatostatinanaloge, wie Octreotid (Sandostatin); oder 5 α -Reductaseinhibitoren, wie N-(1-Cyano-1-methyl-ethyl)-4-aza-3-oxo-5 α -androst-1-en-17 β -carboxamid (siehe EP 0 538 192);

(F) Modifikatoren für biologische Vorgänge (biological response agents), insbesondere Lymphokine, wie Aldesleukin (humanes rekombinantes IL-2, Proleukin); oder Interferone, wie Interferon- α (Intron-A, Roferon) oder Interferon "B₁B₂B₃D₄" (siehe EP 0 205 404);

(G) Inhibitoren von Protein-Tyrosinkinasen und/oder Serin/Threoninkinasen, wie N-[5-[4-Methyl-piperazino-methyl]-benzoylamido]-2-methyl-phenyl]-4-(3-pyridyl)-2-pyrimidin (siehe EP 0 546 409), N-(3-Chlorphenyl)-4-(2-(3-hydroxy)-propyl-amino-4-pyridyl)-2-pyrimidinamin (siehe EP 0 606 046), N-Benzoyl-stauroporin (siehe EP 0 296 110), 4,5-bis(Anilino)-phthalimid (siehe EP 0 516 588), N-(5-N-Benzoylamo-2-methyl-phenyl)-4-(3-pyridyl)-2-pyridinamin (siehe EP 0 564 409) oder 4-(m-Chloranilino)-5,6-dimethyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin (siehe EP 0 682 027);

(H) Antisense-Oligonucleotide oder Oligonucleotidderivative, beispielsweise auf raf (siehe WO 95/32987) oder PKC zielend, auf SAMDC (PCT-Anmeldung WO 96/05298); oder

(I) gemischt wirkende Agentien oder Agentien mit anderen oder unbekannten Wirkmechanismen, beispielsweise S-Triazinderivate, z. B. Altretamin (Hexalen); Enzyme, wie Asparaginase (Elspar); Methylhydrazinderivate, wie Dacarbazin und Procarbazin; Matrinetalloproteinaseinhibitoren, Hexamethylmelamin, Pentamethylmelamin; Anthrachinone wie Mitoxantrone (Novantrone); Mitotische Spindelgifte wie Paclitaxel (Taxol), Epothilon A, Epothilon B, Epothilonderivate oder Discodermolid; Streptozocin (Zanosar); Estracyt (Estramustin); Amsacrin; Agentien mit Zelldifferenzierungswirkung, wie All-transretinsäure (TRA); Immunomodulatoren, wie Levamisol (Ergamisol); Vakzine, z. B. Anti-melanomvakzine (siehe EP 0 674 097); oder Antikörper, die gegen Tumoren wirksam sind, z. B. gegen Melanom-Antigene gerichtete Antikörper (siehe EP 0 640 131), Antikörper zur aktiven Immuntherapie von Melanomen (siehe EP 0 428 485), Antikörper gegen Dickdarmkrebs (Panorex[®]), Antikörper gegen Non-Hodkin-Lymphom (Rituximab), Antikörper gegen Brustkrebs (Trastuzumab), Antiidiotyp-Antikörper wie Tri-aAb[®] oder CeaVac[®] (Titan Pharmaceuticals, Inc.) und mit dem aus elf Aminosäuren bestehenden Abschnitt des TAT-Proteins des AIDS-Virus, der das Durchdringen von Zellmembranen bewirkt, konjugierte (beispielsweise rekombinante) Proteine, wie die Zellregulation beeinflussende Proteine oder entsprechend modifizierte Antikörper, die innerhalb der Krebszelle entartete Proteine, wie entartete Tyrosin- oder Serin/Threoninkinasen, binden und so inaktivieren können).

[0041] Als gegen Infektionen wirksame Verbindungen können insbesondere Antibiotika, antivirale Wirkstoffe, wie z. B. Hemmstoffe der Reversen Transkriptase oder retrovirale Proteasen, wie der HIV-Protease, oder gegen Virus-Hepatitis (wie HCV) wirksame Wirkstoffe, wie Interferon (insbesondere Interferon- α -2) und/oder Ribavirin, oder Antikörper Verwendung finden.

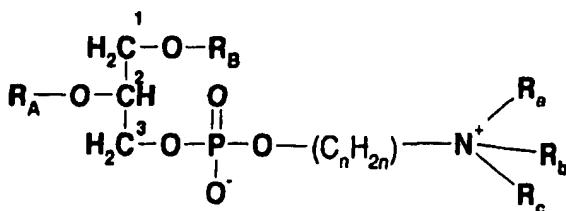
[0042] Die genannten Verbindungen können auch als Salze, insbesondere pharmazeutisch verwendbare Salze, vorliegen, wenn sie geeignete salzbildende Gruppen haben. Salze von Wirkstoffen mit basischen Gruppen können beispielsweise Säureadditionssalze sein, wie Halogenide, Methansulfonate oder Sulfate, Wirkstoffe mit sauren Gruppen können Salze mit Basen, wie Metallen oder Ammoniumsalze von Ammoniak oder substituierten Aminen sein. Die Wirkstoffe können entweder direkt (vorzugsweise überspace) kovalent an superparamagnetische Kugelchen gekoppelt (konjugiert) sein, oder in Liposomen eingearbeitet sein, welche mit superparamagnetischen Beads markiert sind oder werden können, die nicht-kovalent (beispielsweise durch mit Lipiden konjugierte Antigene, die auf der Liposomenoberfläche präsentiert werden und das Andocken von superparamagnetischen Kugelchen markierten Antikörpern ermöglichen, oder unter Ausnutzung der Biotin/Avidin-bzw. Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung) gebunden sind, oder durch direkte Bindung oder Bindung über Spacer kovalent an die Liposomen gebunden sind (gebunden z. B. an Bestandteile der Liposomenhülle, wie Aminogruppen von Lecithinen, oder Amino-, Hydroxy- oder Carboxygruppen an Acylresten, die zu den liposomenbildenden Phospholipiden gehören, oder dergleichen). Alternativ kann superparamagnetisches Material, beispielsweise direkt entsprechende Eisenoxidpartikelchen, direkt in die Liposomen eingebaut vorliegen. Auch lediglich durch Antikörper (die gleichzeitig auch als therapeutische Wirkstoffe fungieren können) markierte superparamagnetische Beads können verwendet werden, da diese ebenfalls entsprechende erkrankte Zellen erkennen und der Behandlung mit DM-Feldern zugänglich machen.

[0043] Beispiele für Liposomenformulierungen sind bekannt; so umfasst eine im Rahmen der Erfindung verwendbare

DE 100 20 376 A 1

Liposomendispersion (phospholipid-stabilisierte Dispersion)

a) ein Phospholipid oder mehrere Phospholipide der Formel A,



5

10

15

(A),

worin R_A C_{10-20} -Acyl, R_B Wasserstoff oder C_{10-20} -Acyl, R_a , R_b und R_c Wasserstoff oder C_{1-4} -Alkyl und n eine ganze Zahl von zwei bis vier darstellen, gewünschtenfalls

b) ein weiteres Phospholipid oder mehrere weitere Phospholipide;

20

c) den oder die Wirkstoffe und

d) eine pharmazeutisch annehmbare Trägerflüssigkeit und gewünschtenfalls weitere Hilfsstoffe und/oder Konser-
vierungsmittel.

[0044] Das Herstellungsverfahren für diese Dispersionen ist dadurch gekennzeichnet, dass man eine Lösung oder Suspension der Komponenten a) und c) oder a), b) und c), vorzugsweise von a) und b) in einem Gewichtsverhältnis von 20 : 1 bis 1 : 5, insbesondere von 5 : 1 bis 1 : 1, durch Verdünnung mit Wasser in eine Dispersion umwandelt, anschließend das organische Lösungsmittel entfernt, beispielsweise durch Zentrifugation, Gelfiltration, Ultrafiltration oder insbesondere durch Dialyse, z. B. tangentiale Dialyse, vorzugsweise gegen Wasser, die erhaltene Dispersion, vorzugsweise nach Zugabe von Hilfsstoffen oder Konservierungsmitteln, erforderlichenfalls unter Einstellung eines annehmbaren pH-Wertes durch Zugabe von pharmazeutisch annehmbaren Puffern, wie Phosphatsalzen oder organischen Säuren (rein oder gelöst in Wasser), wie Essigssäure oder Zitronensäure, vorzugsweise zwischen pH 3 und 6, z. B. pH 4–5, falls sie nicht bereits die richtige Wirkstoffkonzentration hat, konzentriert, vorzugsweise auf eine Wirkstoffkonzentration von 0,2 bis 30 mg/ml, insbesondere von 1 bis 20 mg/ml, wobei die Konzentrierung vorzugsweise nach den zuletzt genannten Methoden zur Entfernung eines organischen Lösungsmittels erfolgt, insbesondere durch Ultrafiltration, z. B. unter Verwendung einer Apparatur zur Durchführung tangentialer Dialyse und Ultrafiltration.

25

30

35

[0045] Die nach diesem Verfahren herstellbare, durch Phospholipide stabilisierte Dispersion ist bei Zimmertemperatur mindestens mehrere Stunden stabil, reproduzierbar bezüglich des Mengenanteils der Komponenten und toxikologisch unbedenklich und daher insbesondere für die orale oder intravenöse Verabreichung am Warmblüter, insbesondere Menschen, geeignet.

40

[0046] Die Größenordnung der erhaltenen Partikel in der Dispersion ist variabel und liegt vorzugsweise zwischen ca. $1,0 \times 10^{-8}$ bis ca. $1,0 \times 10^{-5}$ m, insbesondere zwischen etwa 10^{-7} und etwa 2×10^{-6} m.

45

[0047] Die Nomenklatur der Phospholipide der Formel A und die Bezifferung der C-Atome erfolgt anhand der in Eur. J. of Biochem. 79, 11–21 (1977) "Nomenclature of Lipids" von der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN) gegebenen Empfehlungen (sn-Nomenklatur, stereospecific numbering).

50

[0048] In einem Phospholipid der Formel A sind R_A und R_B mit den Bedeutungen C_{10-20} -Acyl vorzugsweise geradketiges C_{10-20} -Alkanoyl mit einer geraden Anzahl an C-Atomen (unsubstituiert oder substituiert, insbesondere durch funktionelle Gruppen, die ein Ankoppeln an Antikörper, Beads oder dergleichen erlauben, z. B. Hydroxy, Amino oder Carboxy) und geradketiges C_{10-20} -Alkenoyl mit einer Doppelbindung und einer geraden Anzahl an C-Atomen (unsubstituiert oder substituiert, insbesondere durch funktionelle Gruppen, die ein Ankoppeln an Antikörper, Beads oder dergleichen erlauben, z. B. Hydroxy, Amino oder Carboxy, wobei Amino oder Hydroxy aus Stabilitätsgründen nicht an C-Atome gebunden sein sollten, von denen die Doppelbindung ausgeht).

55

[0049] Geradketiges C_{10-20} -Alkanoyl R_A und R_B mit einer geraden Anzahl an C-Atomen sind beispielsweise n-Dodecanoyl, n-Tetradecanoyl, n-Hexadecanoyl oder n-Octadecanoyl. Geradketiges C_{10-20} -Alkenoyl R_A und R_B mit einer Doppelbindung und einer geraden Anzahl an C-Atomen sind beispielsweise 6-cis-, 6-trans-, 9-cis- oder 9-trans-dodecenoyl, -tetradecenoyl, -hexadecenoyl, -octadecenoyl oder -icosenoyl, insbesondere 9-cis-octadecenoyl (Oleoyl).

60

[0050] In einem Phospholipid der Formel A ist n eine ganze Zahl von zwei bis vier, vorzugsweise zwei. Die Gruppe der Formel $-(C_nH_{2n})-$ stellt unverzweigtes oder verzweigtes Alkylen dar, z. B. 1,1-Ethylen, 1,1-, 1,2- oder 1,3-Propylen oder 1,2-, 1,3- oder 1,4-Butylen. Bevorzugt ist 1,2-Ethylen ($n = 2$).

65

[0051] Phospholipide der Formel A sind beispielsweise natürlich vorkommende Kephaline, worin R_a , R_b und R_c Wasserstoff bedeuten oder natürlich vorkommende Lecithine, worin R_a , R_b und R_c Methyl bedeuten, z. B. Kephalin oder Lecithin aus Sojabohnen, Rinderhirn, Rinderleber oder Hühnerei mit verschiedenen oder identischen Acylgruppen R_A und R_B oder Mischungen davon. Der Begriff "natürlich vorkommende" Phospholipide der Formel A definiert Phospholipide, welche bezüglich R_A und R_B keine einheitliche Zusammensetzung haben. Solche natürlichen Phospholipide sind ebenfalls Lecithine und Kephaline, deren Acylgruppen R_A und R_B strukturell undefinierbar und von natürlich vorkommenden Fettsäuregemischen abgeleitet sind.

65

[0052] Bevorzugt sind synthetische, im wesentlichen reine Phospholipide der Formel A mit verschiedenen oder identischen Acylgruppen R_A und R_B . Der Begriff "synthetisches" Phospholipid der Formel A definiert Phospholipide, welche

bezüglich R_A und R_B eine einheitliche Zusammensetzung haben. Solche synthetischen Phospholipide sind vorzugsweise die unten definierten Lecithine und Kephaline, deren Acylgruppen R_A und R_B eine definierte Struktur haben und von einer definierten Fettsäure mit einem Reinheitsgrad höher als ca. 95% abgeleitet sind. R_A und R_B können gleich oder verschieden und ungesättigt oder gesättigt sein. Bevorzugt ist R_A gesättigt, z. B. n-Hexadecanoyl, und R_B ungesättigt, z. B. 9-cis-Octadecenoyl (= Oleoyl).

[0053] Der Begriff "im wesentlichen reines" Phospholipid definiert einen Reinheitsgrad von mehr als 70% (Gew.) des Phospholipids der Formel A, welcher anhand geeigneter Bestimmungsmethoden, z. B. papierchromatographisch, nachweisbar ist.

[0054] Besonders bevorzugt sind synthetische, im wesentlichen reine Phospholipide der Formel A, worin R_A die Bedeutung geradketiges C_{10-20} -Alkanoyl mit einer geraden Anzahl an C-Atomen und R_B die Bedeutung geradketiges C_{10-20} -Alkenoyl mit einer Doppelbindung und einer geraden Anzahl an C-Atomen haben. R_a , R_b und R_c sind Methyl und $n = 2$.

[0055] In einem besonders bevorzugten Phospholipid der Formel A bedeuten R_A n-Do decanoyl, n-Tetradecanoyl, n-Hexadecanoyl oder n-Octadecanoyl und R_B 9-cis- Dodecenoyl, 9-cis-Tetradecenoyl, 9-cis-Hexadecenoyl, 9-cis-Octadecenoyl oder 9-cis-Icosenoyl. R_a , R_b und R_c sind Methyl und n ist 2. Ein ganz besonders bevorzugtes Phospholipid der Formel A ist synthetisches 1-n-Hexadecanoyl-2-(9-cis-octadecenoyl)-3-snphosphatidylcholin mit einer Reinheit von mehr als 95%. Bevorzugte natürliche, im wesentlichen reine Phospholipide der Formel A sind insbesondere Lecithin (L- α -Phosphatidylcholin) aus Sojabohnen oder Hühnerei.

[0056] Für die Acylreste in den Phospholipiden der Formel A sind auch die in Klammern angegebenen Bezeichnungen gebräuchlich: 9-cis-Dodecenoyl (Lauroleoyl), 9-cis-Tetradecenoyl (Myristoleoyl), 9-cis-Hexadecenoyl (Palmitoleoyl), 6-cis-Octadecenoyl (Petroseloyl), 6-trans-Octadecenoyl (Petroselaidoyl), 9-cis-Octadecenoyl (Oleoyl), 9-trans-Octadecenoyl (Elaidoyl), 11-cis-Octadecenoyl (Vaccenoyl), 9-cis-Icosenoyl (Gadoleoyl), n-Dodecanoyl (Lauroyl), n-Tetradecanoyl (Myristoyl), n-Hexadecanoyl (Palmitoyl), n-Octadecanoyl (Stearoyl), n-Icosanoyl (Arachidoyl). Weitere Phospholipide sind vorzugsweise Ester von Phosphatidsäure (3-sn-Phosphatidsäure) mit den genannten Acylresten, wie Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin.

[0057] In der Trägerflüssigkeit d) sind die Komponenten a), b) und c) oder a) und c) als Liposomen so enthalten, dass sich mehrere Tage bis Wochen keine Feststoffe oder feste Aggregate wie Mizellen zurückbilden und die Flüssigkeit mit den genannten Komponenten, gegebenenfalls nach Filtration, vorzugsweise oral oder intravenös, applizierbar ist.

[0058] In der Trägerflüssigkeit d) können pharmazeutisch annehmbare, nicht toxische Hilfsstoffe enthalten sein, z. B. wasserlösliche Hilfsstoffe welche zur Herstellung von isotonischen Bedingungen geeignet sind, z. B. ionische Zusätze wie Kochsalz oder nichtionische Zusätze (Gerüstbildner) wie Sorbit, Mannit oder Glucose oder wasser lösliche Stabilisatoren für die Liposomendispersion wie Lactose, Fructose oder Saccharose. Zusätzlich zu den wasserlöslichen Hilfsstoffen können in der Trägerflüssigkeit für flüssige pharmazeutische Formulierungen verwendbare Emulgatoren, Netzmittel oder Tenside vorhanden sein, insbesondere Emulgatoren wie Ölsäure, nichtionische Tenside vom Typ Fettsäure-Polyhydroxyalkoholester wie Sorbitanmonolaurat, -oleat, -stearat oder -palmitat, Sorbitantristearat oder -trioleat, Polyoxyethylen-Addukte von Fettsäure-Polyhydroxyalkoholestern wie Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat, -oleat, -stearat, -palmitat, -tristearat oder -trioleat, Polyethylenglycol-Fettsäureester wie Polyoxyethylstearat, Polyethylenglycol-400-stearat, Polyethylenglycol-2000-stearat, insbesondere Ethylenoxid-Propylenoxid Blockpolymere vom Typ Pluronic® (Wyandotte Chem. Corp.) oder Syneronic® (ICI).

[0059] Von freiem Wirkstoff können die Liposomen beispielsweise durch Gelfiltration getrennt werden, so daß in der verbleibenden Dispersion nur kein oder sehr wenig Wirkstoff außerhalb der Liposomen vorliegt.

[0060] Superparamagnetische Kugelchen können entweder anschliessend kovalent gebunden werden (beispielsweise durch Zugabe bifunktionaler Cross-Linker), oder es können beispielsweise im Gemisch der Komponenten (a) bis (d) antigene Komponenten, die sich in der Membran einbauen (z. B. rekombinante Membranproteine, wie CD4 oder CD8, oder niedermolekulare Haptene, wie Dinitrophenol, die beispielsweise an Stelle von den Resten R_a , R_b oder R_c vorliegen, an die dann mit den entsprechenden Antikörpern konjugierte superparamagnetische Kugelchen gebunden werden können, oder man stellt durch Bindung von Biotin über einen Spacer, beispielsweise anstelle eines der Reste R_a , R_b und/oder R_c , und Bindung von mit Avidin oder Streptavidin konjugierten superparamagnetischen Kugelchen die superparamagnetisch markierten Liposomen her; der oder die Liposomen selbst werden mit paramagnetischen Materialien, wie kleinsten Eisenoxidteilchen, die direkt bei der Herstellung der Liposomen zugegeben werden, neben dem Wirkstoff auch mit diesen Teilchen beladen und sind so selbst eine Art superparamagnetische Kugelchen. Bevorzugte Konservierungsmittel sind z. B. Antioxidantien, wie Ascorbinsäure, oder Microbizide, wie Sorbinsäure oder Benzoësäure.

[0061] Besonders bevorzugt sind mit (insbesondere gegen infizierte Zellen, wie HIV-infizierte Lymphozyten oder Virus (z. B. HCV)-infizierte Leberzellen, oder Tumorzellen gerichtete) Antikörpern konjugierte superparamagnetische Beads, oder mit superparamagnetischen Beads und entsprechenden Antikörpern gekoppelte wirkstoffhaltige Liposomen, die sich jeweils nach Injektion am Ort des Tumors anreichern und die direkt mittels der DM-Felder in Bewegung versetzt werden und so durch mechanischen Stress oder im Falle der Liposomen zusätzlich Wirkstofffreisetzung unter dem Einfluss des DM-Feldes direkt am Ort der infizierten Zellen oder Tumorort Antitumorwirkung ermöglichen. Analog ist die Verwendung gegen Parasiten gerichteter Antikörper möglich.

[0062] Die Administrationswege umfassen, unter anderem, die enterale, wie nasale, orale oder rektale; oder die parenterale, wie intradermale, subkutane, intramuskuläre, jedoch insbesondere die intravaskuläre (insbesondere intravenöse), intralumbale, intracraniale oder intracavitaire (z. B. in die Bauchhöhle oder andere Körperhöhlen, in Muskelfascien oder dergleichen) Injektion bzw. intravaskuläre Infusion.

[0063] Die enterale (z. B. orale) Administration ist insbesondere geeignet zur Behandlung von Erkrankungen, die vom Darm-, Lungen-, Rachen-, Mund- und/oder Nasenlumen aus zugänglich sind. Innerhalb der entsprechenden Räume können durch DM-Felder die superparamagnetischen Beads, beispielsweise gekoppelt mit Wirkstoffen oder wirkstofftragenden Liposomen, gewünschtenfalls an die gewünschten Stellen im Körper manövriert werden.

[0064] Die parenterale Verabreichung ist besonders geeignet zur Behandlung von Erkrankungen, die über die Blutbahn

erreicht werden können (insbesondere Infusion, intravaskuläre Injektion), hinter der Blut-Himchung) vor dem Zugang der Wirksubstanz geschützt sind oder von Körperhöhlen (z. B. Bauchhöhle, Interpleuralspalt, Interfazikulärraum oder dergleichen) aus zugänglich sind, wobei im Falle der Körperhöhlen wiederum die Möglichkeit besteht, mittels DM-Feldern superparamagnetisch markierten Wirkstoff oder entsprechend markierte wirkstoffhaltige Liposomen an die gewünschten Stellen zu manövrieren. Die Administration kann lokal (am Ort der zu behandelnden Erkrankung, z. B. durch Injektion) oder systemisch (z. B. durch intravaskuläre Injektion oder Infusion) erfolgen.

[0065] Die an Warmblüter, z. B. Menschen von etwa 70 kg Körpergewicht, zu verabreichenden Dosismengen, als Menge an Wirksubstanz ausgedrückt, variieren je nach Spezies, Alter, individuellem Zustand, Applikationsweise und dem jeweiligen Krankheitsbild und liegen für nichtpolymere Wirkstoffe (andere als z. B. Proteine oder Antikörper) insbesondere zwischen etwa 0,1 mg und etwa 10 g, vorzugsweise zwischen etwa 0,4 mg und etwa 4 g, z. B. bei ungefähr 1 mg bis 1,5 g pro Person und Tag, verteilt auf vorzugsweise 1 bis 3 Einzeldosen, die z. B. gleich gross sein können. Im Falle polymerer Wirkstoffe liegt die Dosis, als Menge des Wirkstoffes ausgedrückt, vorzugsweise zwischen 0,05 und 50 mg, vorzugsweise zwischen 0,1 und 10 mg pro Person und Tag. Ueblicherweise erhalten Kinder die halbe Dosis von Erwachsenen. Bei Bedarf kann man die Behandlung solange durchführen, wie es zur Tumorbehandlung und/oder zur Verhinderung der Bildung von Metastasen erforderlich ist.

[0066] Zum Koppeln von Wirkstoffen oder Liposomen (mit oder ohne Antikörpermarkierung, mit Wirkstoff beladen) (nachfolgend beide als Reaktionspartner A bezeichnet) an superparamagnetische Beads (nachfolgend als Reaktionspartner B bezeichnet), oder von (insbesondere Infektions-, Parasiten- oder tumorspezifischen) Antikörpern (Reaktionspartner A) an Liposomen oder superparamagnetische Beads (jeweils Reaktionspartner B), die mit Wirkstoff beladen sind, finden gängige Verfahren Verwendung, z. B. die Cyanogenbromid-Aktivierung etwa der Beads-Oberfläche bei Vorliegen von OH-Gruppen, oder die schonendere Behandlung mit heterobifunktionalen Kopplungsreagentien, die zunächst mit auf dem zu koppelnden Molekül oder der Beads Oberfläche oder Liposom vorliegenden funktionellen Gruppen, insbesondere Hydroxy-, Amino-, Carboxy-, Epoxid-, Thiol- oder Diengruppen enthaltenden Gruppen oder reaktiven Formen davon reagieren können und dann anschließend oder im gleichen Ansatz zur im wesentlichen selben Zeit mit Gruppen auf den zu bindenden Molekülen oder Antikörpern. Nichtkovalente Bindung ist möglich, indem an Reaktionspartner A z. B. Avidin oder Streptavidin gekoppelt wird, an den zu bindenden Reaktionspartner B Biotin, oder umgekehrt.

[0067] Die kovalente Kopplung kann beispielsweise an epoxy- oder als aktivierte Ester funktionalisierten Carboxygruppen (reaktive Form) erfolgen. Die reaktiven Carboxygruppen können auch *in situ* hergestellt werden (z. B. unter Verwendung von in der Peptidchemie üblichen Reagentien, z. B. zur Herstellung von 1-Hydroxybenzotriazol-, Succinimid- oder N-Hydroxysuccinimid-estern, oder *in-situ*-Derivatisierung z. B. mit Carbodiimiden, wie Dicyclohexylcarbodiimid, mit Carbonylimidazol, mit N-[(Dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridin-1-yl)methylene]-N-methylmethanaminiumhexafluorophosphat-N-oxid(HATU); mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (HBTU), mit 2-(Pyridon-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TPTU); oder Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP), oder ähnlichen Reagentien). Die Umsetzung findet dann vor allem mit Amino-, aber auch Hydroxy- oder Mercaptogruppen am zu koppelnden Gegenpartner statt. Auch (i) Azid- oder (ii) Dien-modifizierte Reaktionspartner A oder B können mit ihren jeweiligen komplementären Reaktionspartnern umgesetzt werden, die im Falle (i) Diengruppen, im Falle (ii) Azidgruppen enthalten, die gemeinsam für eine Diels-Alder-Kopplung geeignet sind.

[0068] Als heterobifunktionale Reagentien können beispielsweise solche verwendet werden, die eine Gruppe umfassen, die mit Amino-, Hydroxy- oder Mercaptogruppen reagieren, und eine weitere Gruppe enthalten, die ein Disulfid ist und nachfolgend unter Freisetzung einer Mercaptogruppe (z. B. mit Dithiothreitol oder ähnlichen Reduktionsmitteln) umgesetzt werden kann. Andere mögliche heterobifunktionale Reagentien tragen z. B. eine aminoreaktive Gruppe und eine photoaktivierbare Gruppe, z. B. N-Hydroxysuccinimidoyl-4-azido-salicylsäure. Wieder andere heterobifunktionale Reagentien umfassen z. B. eine Amino- und eine Mercapto-reaktive Gruppe, oder zwei unterschiedliche Amino-reaktive Gruppen, z. B. Succinimidoyl-maleimididerivate, wie Succinimidoyl-butylphenyl-maleimid, N-ε-Maleimidocapronsäure oder N-(ε-Maleimidocapronsäure), oder dergleichen. Ein Beispiel für ein Hydroxy- und Sulfhydryl-reaktives heterobifunktionales Reagens ist N-(p-Maleimidophenyl)isocyanat.

[0069] Superparamagnetische Beads oder andere Reaktionspartner B können wie erwähnt, durch Cyanogenbromid aktiviert sein, aber auch durch Epoxy-, Nitrophenylchloroformat-, N-Hydroxysuccinimid- oder Chloroformatgruppen aktiviert sein, durch Polyacrylazidoreste (photoaktivierbar), Epoxidgruppen, Bromoacetylgruppen, Epichlorhydrinaktivierung, Tresyl-chlorid-Aktivierung, Vinylsulfon-Aktivierung, oder dergleichen.

[0070] Neue Kombinationsprodukte (z. B. von Antikörpern mit superparamagnetischen Beads, oder von Wirkstoffen mit Liposomen und/oder mit Wirkstoffen) sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0071] Die Erfindung betrifft insbesondere die in den Beispielen genannten Ausführungsformen der Erfindung.

Abbildungen

[0072] Fig. 1 Die Lorentzkraft wird von Antoon Lorentz selbst als eine elektrische Kraft bezeichnet und ähnelt formell in der Tat auch der elektrischen Fernwirkungskraft (Coulombkraft). Die Lorentzkraft wirkt auf elektrische Ladungen in einem magnetischen Feld. Im Demonstrationsversuch der Fig. 1 wird die Wirkung der Lorentzkraft auf Ionen demonstriert. Hierzu wird ein dynamisches, homogenes magnetisches Feld erzeugt (siehe WO 95/19217), welches einen mit einem Gemisch aus Kochsalz, Wasser und Sand (1) gefüllten transparenten Plastikbehälter (3) durchdringt, der hermetisch von der Umgebung abgeschlossen ist. Das dynamische Feld wird verlustarm durch geschichtete Bleche (auch Feldrückwegbleche (2)) geführt.

[0073] Geschichtete Blechpakete sind bei sehr niedrigen Frequenzen der dynamischen Felder (z. B. 15 Hz oder niedriger) nicht notwendig. (4) ist eine symbolische geschlossene Feldlinie, (5) zeigt exemplarisch eine Nutsektion mit Windungsteil (5) des DM-Felderzeugers (6). Weitere Details siehe Beispiel 3. Eine elektrische Kraft, die Lorentzkraft, ist also im Stande, sowohl positive als auch negative Ionen – die magnetisch oder unmagnetisch sein können – in die gleiche

DE 100 20 376 A 1

Richtung zu transportieren. Dies ist mit der Coulombkraft nicht zu erreichen.

[0074] Fig. 2 Diese Abbildung zeigt diesmal nur die magnetischen Aspekte. Über einem DM-Felderzeuger (6) befindet sich ein transparenter Plastikbehälter (8), der mit Wasser gefüllt ist. Eine Magnetikugel (7) kann durch die Flüssigkeit z. B. in und gegen die Pfeilrichtung longitudinal bewegt werden. Mit einem Stück Aluminium anstelle der Magnetikugel (7) ist dies nicht möglich. (9) symbolisiert eine geschlossene Feldlinie, (10) eine Nutsektion mit Windungsteil. Es ist nicht möglich, ein quantenmechanisches Mehrpartikelproblem mathematisch exakt zu beschreiben, doch kann der rein magnetische Charakter der Wirkung des DM-Feldes demonstriert werden.

[0075] Fig. 3 Die Abbildung zeigt eine der möglichen Anwendungen der Erfindung. In der unter dem Mikroskop (12) vor dessen Objektiv (13) auf dem Mikroskopiertisch (14) liegenden Probe (15) befinden sich z. B. Zellen, Zellbestandteile oder Pathogene und eine relativ sehr geringe Zahl (im Extremfall nur 1) mit superparamagnetischen Beads (über entsprechende Antikörper gebunden) markierter Zellen, Zellbestandteile oder Pathogene. Beidseitig neben der Probe liegend erkennt man in den Mikroskopiertisch integrierte DM-Felderzeuger (11) zur Erzeugung der Feldstrukturen. Es kann sich dabei um 2 aktive DM-Felderzeuger, einen DM-Felderzeuger und einen magnetischen Rückweg oder auch nur um einen DM-Felderzeuger ohne Rückweg handeln. Die Probe wird von einem z. B. in Amplitude, Frequenz und Richtung variablen dynamischen Magnetfeld durchdrungen. Der Bobachter kann nun selbständig z. B. die Frequenz, Amplitude oder Richtung des dynamischen, die Probe durchsetzenden Magnetfeldes ändern. Dies wird erreicht, indem elektronische Schaltkreise, klassischen Frequenzumformern gleich, durch Regeleinrichtungen, z. B. Fusspedal, Schalter oder der gleichen, angesteuert werden oder angesteuert und umgeschaltet werden. Hierdurch werden die markierten Objekte elektromagnetisch entsprechend beeinflusst. Es können z. B. konstante/nichtkonstante Drehungen der markierten Objekte (Drehimpulserhaltung) im mathematisch positiven oder negativen Sinne erreicht werden. Hierdurch können noch wenige, gar einzelne markierte Objekte, unter einer Vielzahl nicht markierter erkannt werden. Es kann jedoch auch, durch Beobachterschaltung der Regelkreise, das dynamische Magnetfeld in mehrere unabhängige statische Magnetwechselfelder aufgeteilt werden, was ein magnetisches "Erstarren" der beobachteten Objekte zur Folge hat. All dies ermöglicht die Beobachtung einzelner markierter Objekte zwischen einer Vielzahl von anderen unmarkierten Objekten mit einer hohen Selektivität.

[0076] Fig. 4 Diese Abbildung zeigt unter (16) ungeordnete markierte Objekte (z. B. Zellen). Diese werden in (17) in Rotationsbewegungen versetzt (siehe Beschreibung hierzu unter Fig. 3). Es können auch entgegengesetzte Rorationsbewegungen erzielt werden, oder permanente Wechsel in der Rotationsbewegung. Unter (18) wird eine Strukterzeugung (stabförmig) der markierten Objekte gezeigt (Beschreibung hierzu siehe unter Fig. 3). Es können gezielte Wanderbewegungen der markierten Objekte erreicht werden, durch die andere, auch nicht-markierte Objekte markiert und transportiert werden können.

[0077] Die nachfolgenden Beispiele dienen der Illustration der Erfindung, ohne ihren Umfang einschränken zu sollen.

Beispiel 1

35

Markierung von Lymphocyten

[0078] Gewinnung von Lymphocyten aus Blut: 20 IE Heparin pro ml Blut werden in einer 20-ml-Injektionsspritze vorgelegt und darin Venenblut aufgezogen. Diesem Heparinblut werden ca. 4 ml Macrodex 6 % (Fa. Knoll, Ludwigshafen, Deutschland) zugesezt und die Spritze bei Raumtemperatur ca. 1 Stunde lang in einen Ständer gestellt. Nach dieser Zeit wird der nahezu erythrocytenfreie Überstand in einer zweiten Spritze mit Kanüle aufgenommen. Das Blut wird 1 : 1 mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (150 mM Natriumchlorid, 150 mM Natriumphosphat, pH 7,2) versetzt. Zur vollständigen Isolierung der Lymphozyten werden 3 ml Lymphocytentrennmedium (Ficoll-Lösung der Dichte 1,077 g/ml) in einem Zentrifugenröhren vorgelegt und 4 ml der Blut/PBS-Lösung vorsichtig auf das Trennmedium geschichtet (vorsichtig pipettieren, um Phasenvermischung zu vermeiden). Nach Verschliessen mit einem Silikonstopfen wird der Gradient bei 400 g (bezogen auf die Röhrenmitte) 30 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (bei der Zentrifugation ist darauf zu achten, dass die elektrische Bremse der Zentrifuge während des Laufs ausgeschaltet bleibt); dabei entstehen 4 Phasen: oberste Schicht Plasma, darunter eine opaque weiße Bande (Peripherie monocytaire Blutzellen), dann das Lymphocytentrennmedium und als Pellet die restlichen Erythrozyten mit den Granulocyten. Das Plasma wird mittels einer Pasteurpipette abgesaugt.

[0079] Gewünschterfalls kann man vorhandene Monocyten entfernen, indem man die Schicht mit den Peripheren monocytaire Blutzellen in eine Petrischale überführt. Die B- und T-Lymphozyten bleiben hier im Überstand, während andere Zelltypen sich an die Oberfläche der Petrischale adsorbieren.

[0080] Die Zellen im Überstand oder (wenn die Monocyten nicht weiter entfernt werden) das abgesaugte Plasma werden sodann in einer Pufferlösung – PBS (möglichst frei von Calcium- und Magnesiumionen, um die Aggregation der Zellen untereinander oder an Oberflächen zu verhindern) mit 2 mM EDTA und 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA), nachfolgend als PBS* bezeichnet – aufgenommen und durch ein Nylon-Netz oder einen Nylonfilter (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) passiert, um Klumpen zu entfernen. Die Zellen werden gezählt und in der zuletzt genannten Pufferlösung durch Zentrifugation gewaschen. Das Pellet mit den Zellen wird anschließend mit MACS Multi-Sort Microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland), die mit CD4- (oder CD-8-)Antikörper markiert sind (es handelt sich um mit anti-CD4-Antikörper (oder mit anti-CD8-Antikörper) konjugierte Kugelchen mit Eisenoxid in einer Polysaccharidmatrix, Durchmesser ca. 50 nm), inkubiert. Die Zellen (10^7 Zellen) werden in 80 µl PBS* aufgenommen. Nach Zusetzen von 20 µl MACS CD4 (oder alternativ CD8) Microbeads-Suspension (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) inkubiert man für 10 min bei 4°C. Nach der Inkubation werden die Zellen in der 10- bis 20-fachen Menge an PBS* aufgenommen, bei $300 \times g$ für 10 min zentrifugiert und nach vollständigem Entfernen des Überstands das Zellpellet in 500 µl Puffer je 10^8 markierte Zellen aufgenommen.

[0081] Anschließend erfolgt die magnetische Anreicherung mittels Säulen, die mit Kugelchen aus kunststoffüberzogenem ferromagnetischem Material gefüllt sind, in Gegenwart eines Magnetfeldes: Eine MS*-Säule (Miltenyi) wird im

DE 100 20 376 A 1

Magnetfeld eines Permanentmagneten (Separator der Firma Miltenyi) plaziert. Die Säule wird vorbereitet durch Wäschens mit 500 Pl PBS*; anschliessend wird die oben hergestellte Zellsuspension aufgetragen. Die nicht markierten Zellen werden mit PBS* (3 x 500 µl) ausgewaschen. Die Säule wird anschliessend aus dem Separator entfernt, über einem geeigneten Sammelröhrenplaziert und mit 1 ml PBS* ausgewaschen. Man erhält die CD4 (oder CD8)-Zellen mit magnetisch markierten Zellen.

5

Beispiel 2

Erkennen magnetisch markierter Zellen unter dem Mikroskop

[0082] Die in Beispiel 1 hergestellten magnetisch markierten Zellen werden anschliessend mikroskopisch mittels eines erfundungsgemässen DM-Feldes in Bewegung (Rotation oder Wanderung) versetzt (Fig. 3), als Vorrichtung zur Erzeugung der magnetischen Feldstrukturen DM-Felderzeuger (11), wobei 2 aktive Felderzeuger verwendet werden, oder alternativ 1 aktiver DM-Felderzeuger und ein magnetischer Rückweg, oder sogar nur ein DM-Felderzeuger ohne magnetischen Rückweg. Es ist möglich, die markierten Zellen auf diese Weise zu bewegen. Dies zeigt, daß das Prinzip der Erfindung tatsächlich anwendbar ist.

10

[0083] In der unter dem Mikroskop liegenden Probe befindet sich eine grosse Anzahl nichtmarkierter Zellen und eine geringere (je nach Probe auch sehr geringe) Anzahl markierter Zellen, markiert mit dem entsprechenden Antikörper und den daran konjugierten Magnetitpartikeln. Beispielsweise durch Hervorrufen konstanter/nicht konstanter Drehungen der markierten Objekte im mathematisch positiven oder negativen Sinne werden konstante/nichtkonstante Drehungen der markierten Zellen erreicht. Auch wenige oder gar einzelne markierte Objekte können so unter einer Vielzahl von anderen erkannt werden. Durch Beobachterbeschaltung der Regelkreise wird das dynamische Magnetfeld in mehrere unabhängige statische Magnetfelder aufgeteilt. Auf diese Weise kann ein Erstarren der markierten Zellen erreicht werden. Auch so können einzelne markierte Zellen zwischen unmarkierten, beweglich bleibenden erkannt werden.

15

20

25

Beispiel 3

Modell für Transport von Salzen innerhalb eines Körpers

[0084] In einem mit einem Gemisch aus Salz, Wasser und Sand (1) gefüllten Plastikbehälter (Fig. 1, (3)) (als Modell für einen Körper) wird gezeigt, dass mit einem DM-Felderzeuger (6) durch Erzeugen von Wanderfeldern Ionen bewegt werden können. Durch Einwirkung der Lorenzkraft wird erreicht, dass, wenn ein dynamisches, homogenes magnetisches Feld gemäss WO 95/19217 erzeugt wird, das den Plastikbehälter (3) durchdringt und verlustarm durch geschichtete Bleche (Felddrückwegbleche (2)) geführt wird, sich nach Abschluss des Experiments mehr von den nichtmagnetischen Natrium- und Chloridionen auf der einen Seite als auf der anderen Seite des Kastens befinden. Mit anderen Worten, das Experiment zeigt auch, dass es möglich ist, Konzentrationsgradienten von Salzen zu produzieren und so beispielsweise auch die Wirkung solcher Gradienten auf Zellen (beispielsweise Makrophagen, Protozoen) in entsprechenden Versuchsanordnungen zu untersuchen.

30

35

40

Beispiel 4

Modell für den Transport magnetischer Partikel in einem Körper oder in Lösungen, insbesondere zum Sortieren von superparamagnetisch markierten Zellen und deren Trennung von nicht markierten Zellen

[0085] Fig. 2 zeigt eine weitere Anordnung, mit der die Bewegung eines magnetischen Partikels (hier eine paramagnetische Kugel (7) – vorliegend als eine Magnetikkugel – als Modell) gezeigt wird. Dieser Versuch wird in einer deutschen Universität als Doppel-Blind-Versuch durchgeführt. Über einem Felderzeuger (6) befindet sich ein transparenter Plastikbehälter (8), der mit Wasser gefüllt ist. Durch Bewegungsfelder wird die Kugel beispielsweise in Pfeilrichtung longitudinal bewegt. Mit einem nicht magnetischen Stück Aluminium gelingt diese Bewegung unter den gleichen Verhältnissen nicht.

45

50

55

Beispiel 5

Bewegung von markierten superparamagnetischen Beads

[0086] Fig. 4 zeigt ungeordnete superparamagnetische Beads (Miltenyi). Durch einen (nicht gezeigten) DM-Felderzeuger werden die ungeordneten Beads (16) entweder durch magnetische Bewegungsfelder in Bewegung versetzt (z. B. Rotation (17) oder gezielte Bewegung (19)) oder es werden mit ihnen durch statische Wechselfelder kompakte, hier linear ausgedehnte Strukturen ausgebildet (dies würde in einem Körper beispielsweise das Verschliessen von Blutgefäßen mittels superparamagnetischer Beads ermöglichen, um so die Blutzufuhr zu einem Tumor oder infizierten Gewebeteilen zu unterbinden und so diese abzutöten). Auch gezielte Wanderbewegung, alternierend mit Drehung, von mit superparamagnetischen Beads markierten Zellen ist möglich (19). Dies zeigt die Anwendbarkeit beispielsweise zum Erkennen spezifischer Zellen (etwa Erkennung von Tumorzellen durch entsprechend mit superparamagnetischen Beads markierte Antikörper) oder insbesondere zur Zellsortierung (Herausziehen der markierten Zellen aus einem Gemisch mit nicht markierten Zellen).

60

65

65

DE 100 20 376 A 1

Patentansprüche

1. Verwendung von dynamischen Magnetfeldern (DM-Felder) zum Erkennen und/oder Sortieren von Zellen, Zellbestandteilen oder Pathogenen, an die superparamagnetische Beads gebunden sind.
- 5 2. Verwendung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennen zur Diagnose von Erkrankungen von Zellen verwendet wird.
3. Verwendung gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass Tumorzellen oder infizierte Zellen erkannt werden, an die superparamagnetische Beads über für diese Zellen spezifische Antikörper gebunden sind.
- 10 4. Verwendung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es extrakorporal angewendet wird.
5. Verwendung eines dynamischen Magnetfeldes zur Reinigung von Flüssigkeiten von Pathogenen, an die superparamagnetische Beads gebunden sind.
- 15 6. Verwendung gemäss Anspruch 4, worin die zu reinigende Flüssigkeit eine Blutkonserve, Plasmakonserve oder ein Zellkulturmedium ist.
7. Verfahren zur Diagnose, insbesondere zum Erkennen von kranken, vor allem infizierten Zellen oder Tumorzellen, welches die Verwendung von dynamischen Magnetfeldern und an die genannten Zellen bindenden superparamagnetisch markierten Beads umfasst.
- 20 8. Verfahren gemäss Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es extrakorporal angewendet wird.
9. Verfahren zur Behandlung erkrankter Zellen, insbesondere von infizierten Zellen oder Tumorzellen, welches die Nutzung von dynamischen Magnetfeldern und superparamagnetischen Beads umfasst, die am Ort der infizierten Zellen oder Tumorzellen vorliegen oder an diese gebunden sind.
10. Verfahren gemäss Anspruch 9, worin die erkrankten Zellen durch superparamagnetische Beads, welche über Antikörper an die erkrankten Zellen gebunden sind, selektiv markiert und durch das Anlegen eines dynamischen Magnetfeldes Stress durch Bewegung ausgesetzt werden.
- 25 11. Verfahren gemäss Anspruch 9, worin die erkrankten Zellen durch superparamagnetische Beads, welche direkt an einen Wirkstoff gekoppelt sind oder an Liposomen, die einen derartigen Wirkstoff tragen, markiert sind und durch das Anlegen eines dynamischen Feldes an den Ort der Wirkung transportiert werden und/oder nach Markierung der erkrankten Zellen so angeregt werden, dass die Zellen dem Wirkstoff verstärkt ausgesetzt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es extrakorporal angewendet wird.
- 30 13. Verwendung von superparamagnetisch markierten Wirkstoffen zur Herstellung eines Präparates zur Anwendung in einem Verfahren zur Behandlung von infizierten Zellen oder Tumorzellen, das die Behandlung mit einem dynamischen Magnetfeld umfasst, die (a) am Ort der genannten Zellen verabreicht, (b) mit einem DM-Feld oder DM-Felderzeuger dorthin manövriert und/oder (c) an die genannten Zellen, insbesondere über an die Beads gebundene, für Antigene auf den zu behandelnden Zellen spezifische Antikörper, gebunden werden oder sind.
- 35 14. Kombination von superparamagnetisch markierten Wirkstoffen oder superparamagnetischen Beads mit einem Erzeuger eines dynamischen Magnetfeldes, geeignet zur Behandlung infizierter Zellen oder Tumorzellen.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

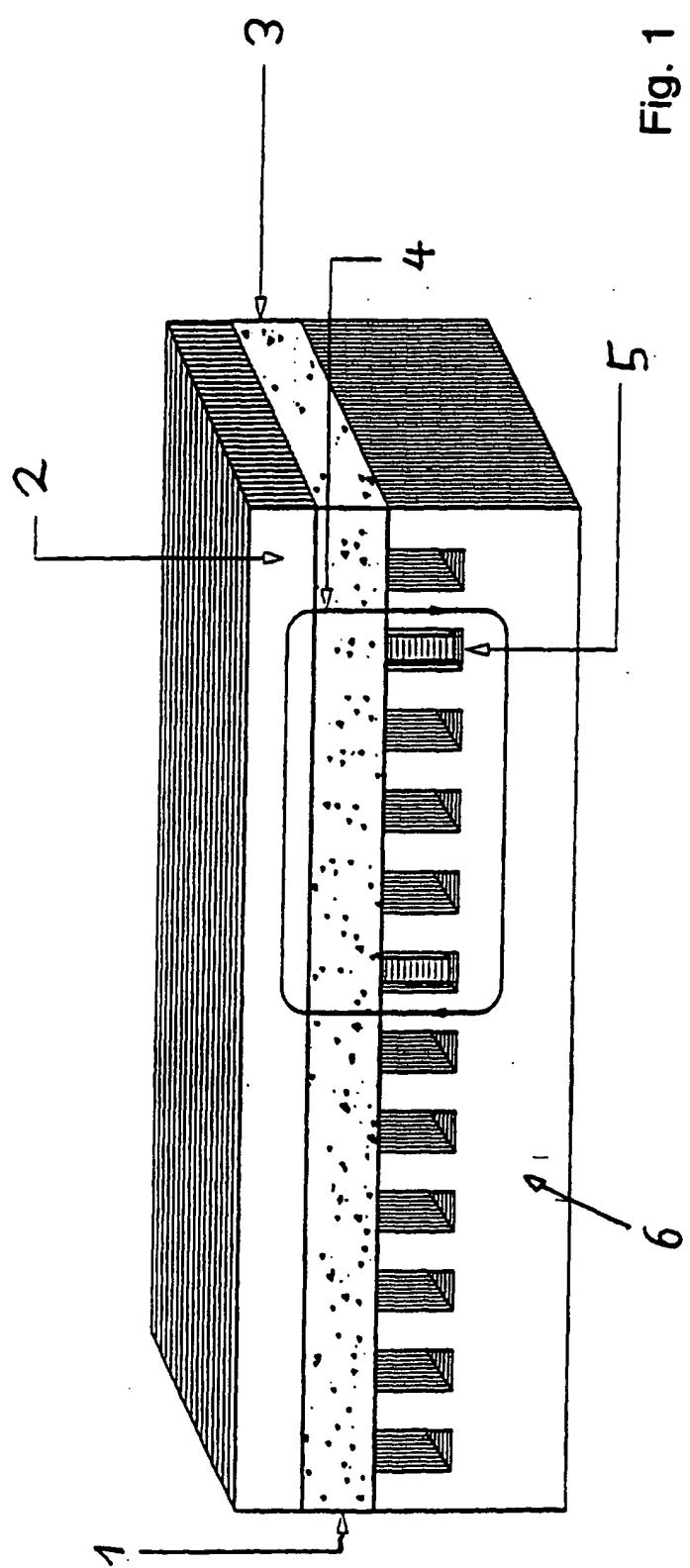
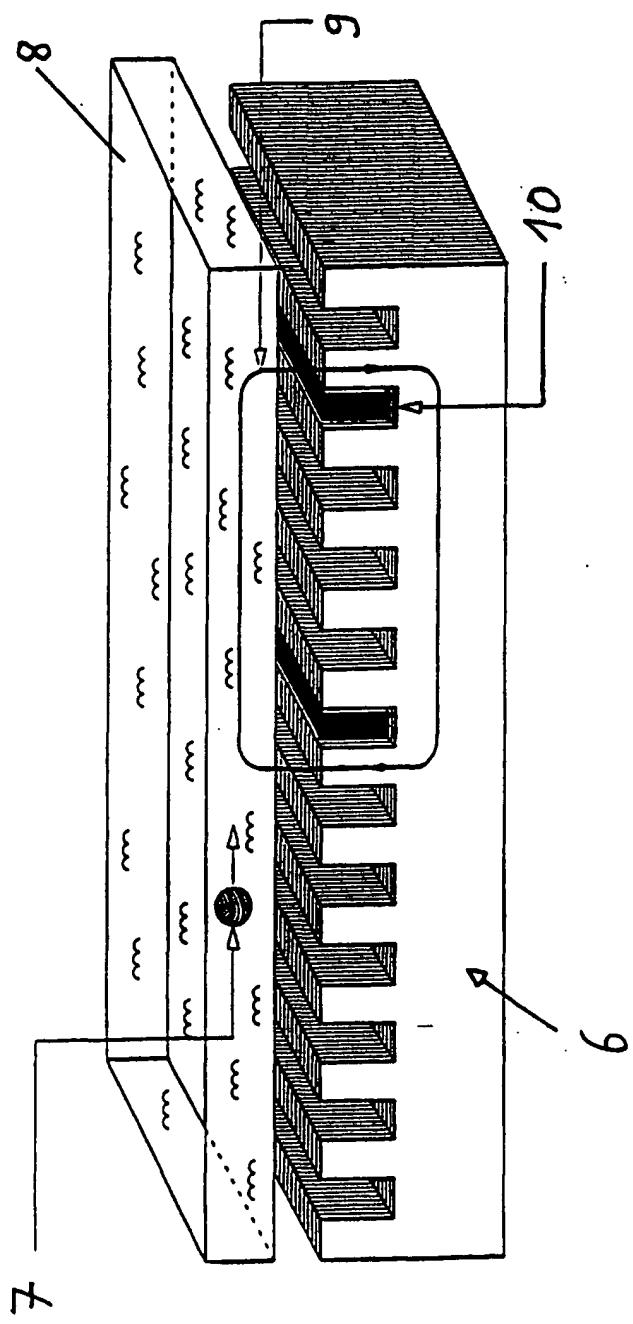


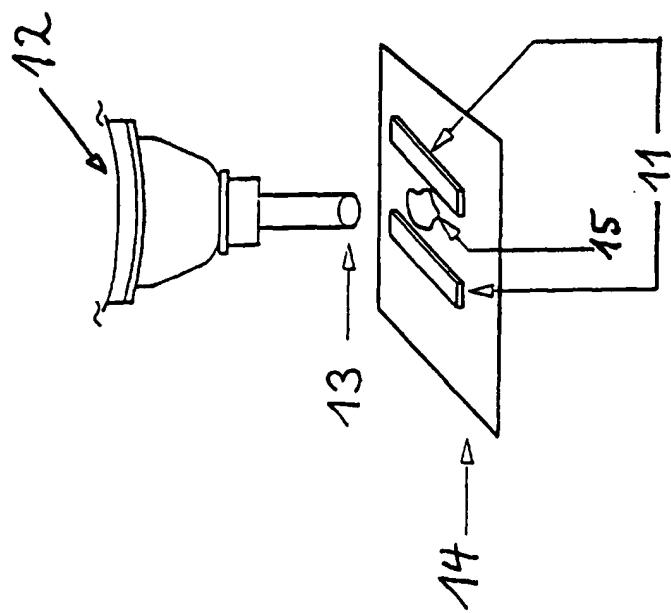
Fig. 1

Fig. 2



BEST AVAILABLE COPY

Fig. 3



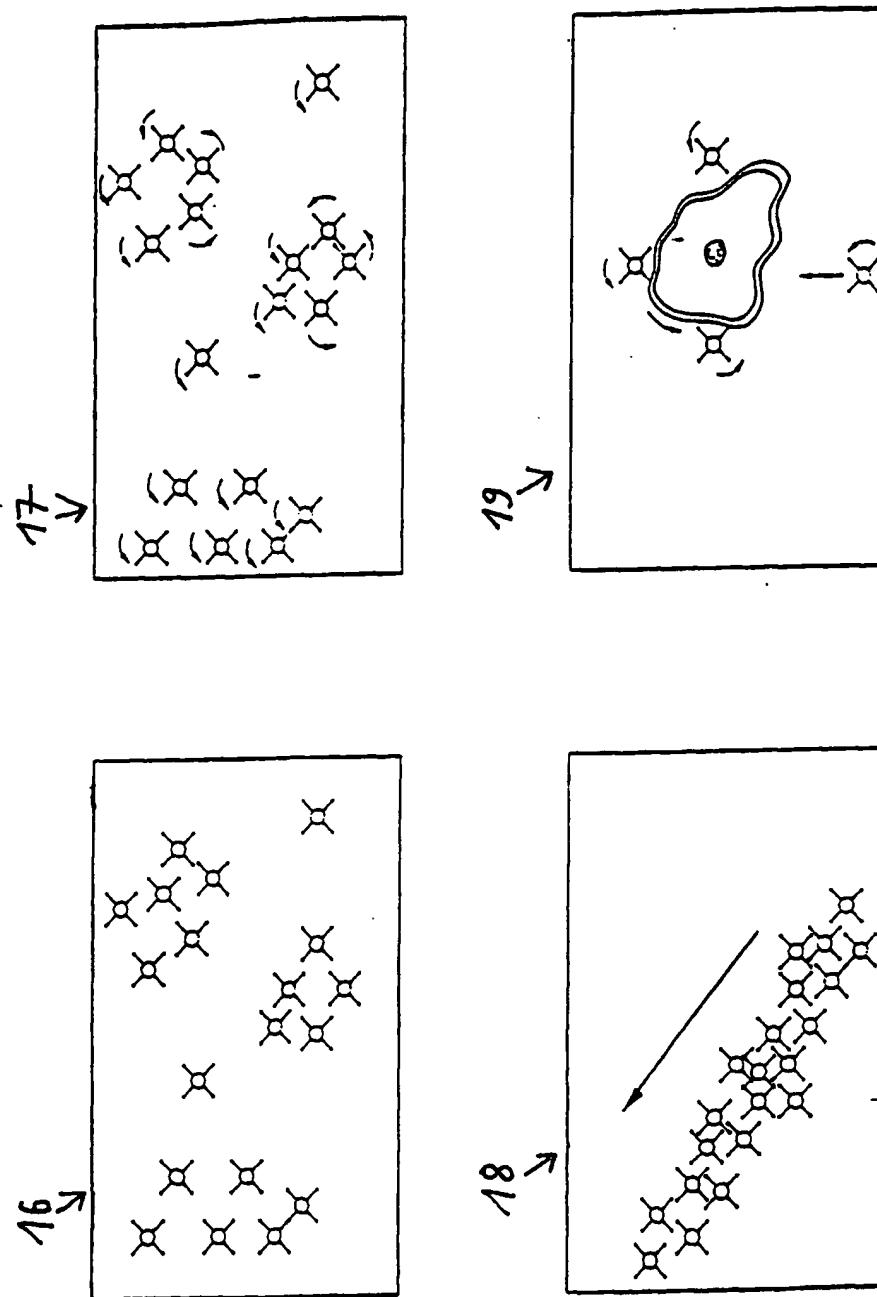


Fig. 4